

L'ipossia induce variazioni nei segnali lipidici di cellule tumorali

Anna Maria LUCIANI, Sveva GRANDE, Alessandra PALMA, Antonella ROSI, Vincenza VITI,
Laura GUIDONI

Dipartimento di Tecnologie e Salute e INFN Gruppo Collegato Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La tecnica della Spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS) ha permesso di acquisire nuove e importanti informazioni sul metabolismo cellulare negli animali e nell'uomo, grazie alla sua capacità di studiare le molecole in modo non invasivo, e di investigare sistemi biologici di diversa complessità, dalle cellule *in vitro*, alle biopsie *ex vivo*, fino ad arrivare agli animali e all'uomo (spettroscopia *in vivo*).

Nella presente comunicazione, la MRS è stata applicata allo studio degli effetti dell'ipossia in cellule tumorali in coltura, allo scopo di ottenere informazioni su metaboliti lipidici e su possibili variazioni nella loro sintesi.

Secondo molti studi, l'ipossia è legata a cambiamenti nel metabolismo cellulare, un campo di indagine di crescente importanza nella ricerca sul cancro. Per questo motivo, una migliore comprensione di tali cambiamenti potrebbe essere preziosa nello studio di efficaci terapie antitumorali.

Il principale effetto dell'ipossia è lo spostamento della glicolisi da aerobica ad anaerobica (il cosiddetto "effetto Warburg"). Studi recenti hanno investigato su diversi aspetti legati a tale condizione, tra cui il cosiddetto fattore ipossia-inducibile ed il destino delle specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) e dei radicali liberi in tale ambiente cellulare modificato.

Tra i segnali osservabili sia *in vitro* che *in vivo* con spettroscopia di Risonanza Magnetica hanno suscitato molto interesse i segnali lipidici, principalmente provenienti dalle catene degli acidi grassi nei lipidi neutri (spesso indicati come lipidi mobili, ML), presenti nelle cellule cancerose. Molti autori hanno suggerito che le intensità dei ML possono agire da indicatori, permettendo di correlare le osservazioni spettroscopiche ad eventi biologici rilevanti, come l'induzione di apoptosi o la morte per necrosi.

Recentemente, è stato segnalato che le intensità dei ML possono essere messe in relazione ai cambiamenti nella sintesi e nella degradazione dei lipidi, che determinano variazioni del *pool* dei trigliceridi.

Nel presente lavoro sono stati esaminati mediante spettroscopia ^1H NMR gli effetti dell'ipossia su due linee cellulari da adenocarcinoma umani: MCF-7 da adenocarcinoma mammario e HeLa da adenocarcinoma della cervice uterina.

Materiali e metodi

Le cellule HeLa, da adenocarcinoma della cervice, e le MCF-7, da adenocarcinoma mammario, sono state cresciute come descritto in (1).

La condizione di ipossia è stata realizzata crescendo le cellule per 24 ore in 2% O_2 , 93% N_2 , 5% CO_2 .

Gli spettri di risonanza magnetica del protone (^1H) sono stati acquisiti a 400.14 MHz su di uno spettrometro digitale *Avance* (Bruker, AG, Darmstadt, Germania) dotato di un *microprobe* con diametro pari a 1mm.

I segnali sono stati acquisiti con un impulso a radiofrequenza di 90° ed una *sweep width* di 4006.4 Hz. La soppressione dell'acqua è stata ottenuta irraggiando selettivamente il segnale.

L'analisi quantitativa degli spettri di RM mono e bi-dimensionali è stata realizzata mediante il software *WinNMR* (Bruker, AG, Darmstadt, Germania).

Risultati e discussione

La regione di un tipico spettro NMR di cellule HeLa in cui si osservano segnali lipidici intensi è riportata in Figura 1.

I protoni metilenici del *bulk* degli acidi grassi risuonano a 1,28 ppm (Lip), parzialmente sovrapposto al segnale del gruppo metilico dell'acido lattico, a 1,32 ppm (Lac). Il gruppo metilico terminale delle catene degli acidi grassi stessi risuona a 0,89 ppm, poco risolto rispetto al segnale delle macromolecole a 0,91 ppm.

Sia i protoni metilici che quelli metilenici danno origine, negli spettri 2D COSY, a *cross peaks* che possono essere usati per la misura quantitativa del segnale NMR, mediante un'operazione di integrazione.

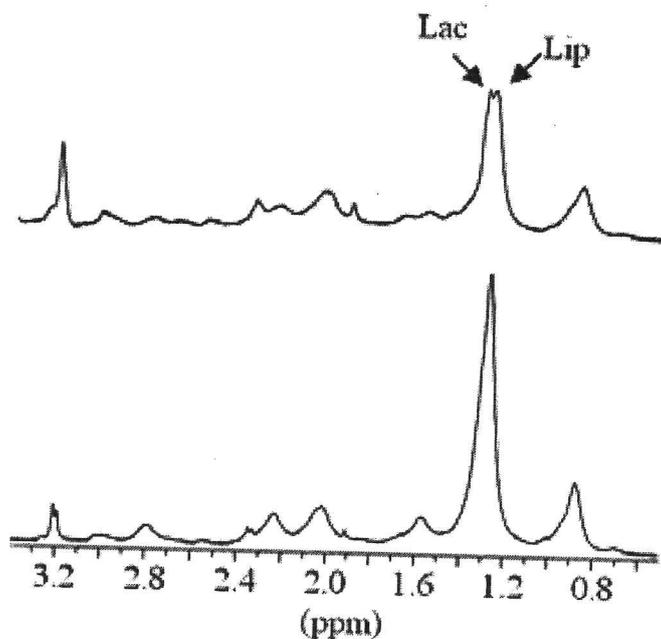


Figura 1: Regione ad alto campo dello spettro ^1H NMR delle cellule HeLa. Traccia superiore: cellule in condizione normossiche; traccia inferiore: cellule in condizioni ipossiche.

Secondo i modelli correnti (2-4) questi segnali provengono dai lipidi neutri, per lo più trigliceridi (Figura 2). Nelle linee cellulari in esame, il confronto fra spettri di cellule intatte e spettri di estratti lipidici in cloroformio/metanolo ha permesso di confermare tale attribuzione (5).

Gli spettri ^1H NMR delle due linee sono stati acquisiti a 24 ore dal trattamento ipossico (Figura 1b) e confrontati con campioni tenuti in condizioni normali (campioni di controllo, Figura 1a).

Dopo il trattamento ipossico sia nelle HeLa che nelle MCF-7 (dati non mostrati) si osserva un marcato aumento dei segnali dei lipidi mobili (confronto tra Fig. 1 a e b per le HeLa).

Tale risultato è stato ottenuto in numerosi esperimenti indipendenti ripetuti in condizioni identiche, ed è stato osservato e misurato quantitativamente anche negli spettri bi-dimensionali COSY.

Le possibili interpretazioni degli effetti osservati sono diverse. In accordo con dati più vecchi (6) e con osservazioni recenti (7), dopo trattamento ipossico la concentrazione dei trigliceridi aumenta.

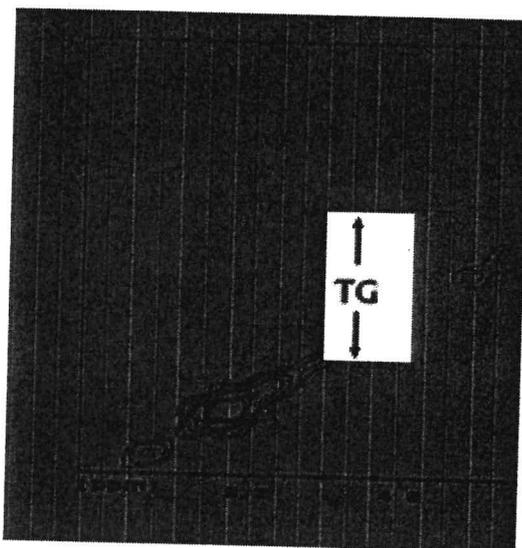


Figura 2: In accordo con i modelli più recenti, i segnali ML provengono da lipidi neutri, principalmente trigliceridi (TG). Negli spettri 2D COSY di cellule HeLa caratterizzate da intensi segnali lipidici, i *cross peaks* dei protoni del glicerolo nei TG sono sempre ben evidenti (vedi freccia).

Alcuni autori (8) hanno mostrato che nelle cellule HT-1080 si ha un accumulo intracellulare di trigliceridi dopo ipossia. Questi autori hanno proposto per le cellule ipossiche l'ipotesi che i lipidi neutri abbiano un ruolo nel convertire gli acidi grassi liberi per far fronte alla riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi, non utilizzabili come sorgente d'energia.

Un'altra possibile interpretazione è legata al ruolo del pH intracellulare. Poiché ci si aspetta che l'ipossia possa alterare il pH intracellulare, il risultato ottenuto può essere messo in correlazione con un possibile effetto indotto dalla diminuzione del pH.

Infatti, in un lavoro sulle cellule C6 di glioma, si è osservato che i segnali lipidici crescono in seguito alla diminuzione di pH (5).

Ulteriori studi sono necessari per chiarire questo punto.

Conclusioni

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare dei tessuti tumorali sono spesso caratterizzati da intensi segnali originanti dagli acidi grassi. Tali segnali sono stati largamente studiati, con l'obiettivo di individuare dei possibili *markers* del metabolismo tumorale.

Il presente lavoro mostra come la spettroscopia NMR del protone possa essere un utile mezzo per individuare l'accumulo di lipidi neutri in condizioni, quali l'ipossia, che si verificano spesso nei tessuti tumorali, così come in altre situazioni patologiche.

I risultati ottenuti suggeriscono un possibile utilizzo dei segnali lipidici come rivelatori della risposta cellulare ad una modifica dell'ambiente.

Bibliografia

- [1] A. Rosi, S. Grande, A.M. Luciani, A. Palma, C. Giovannini, L. Guidoni, O. Saporà, V. Viti. *Role of glutathione in apoptosis induced by radiation as determined by ^1H MR spectra of cultured tumor cells*. Radiat Res. 167, 2007, pp. 268-82.
- [2] J.M. Hakumaki, R.A. Kauppinen. *^1H NMR visible lipids in the life and death of cells*,

- Trends Biochem Sci, 25, 2000, pp. 357-62.
- [3] M. Brauer. *In vivo monitoring of apoptosis*, Prog. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiatry, 27, 2003, pp. 323-331.
- [4] A.C., Kuesel et al. *Mobile lipid accumulation in necrotic tissue of high grade astrocytomas*. Anticancer Res., 16(3B), 1996, pp. 1485-148.
- [5] A.M. Luciani et al., *Characterization of ¹H NMR detectable mobile lipids in cells from human adenocarcinomas*, FEBS J. 276, 2009, pp. 1333-1346.
- [6] G.B. Gordon et al. *Lipid Accumulation in Hypoxic Tissue Culture Cells*. American Journal of Pathology. 88, 1977, pp. 663-674.
- [7] E. Ackerstaff, D. Artemov, R.J. Gillies, Z.M. Bhujwalla. *Hypoxia and the Presence of Human Vascular Endothelial Cells Affect Prostate Cancer Cell Invasion and Metabolism*. Neoplasia 9 (12), 2007, pp.1138-1151.
- [8] K. Gotoa, et al. *Enhanced antitumor activity of xanthohumol, a diacylglycerolacyltransferase inhibitor, under hypoxia*, Cancer Letters 219, 2005, pp. 215-222.